云 南 植 物 研 究 1992; 14 (4): 423—429
Acta Botanica Yunnanica

应用过氧化物酶同工酶鉴定山茶属植物杂种 F1 代的研究

王仲朗　　夏丽芳
(中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204)

摘要　对 4 个杂交组合的 12 个杂种 F1 代植株与亲本进行了形态学比较和过氧化物酶同工酶分析，结果表明以金花茶为父本，云南山茶或云南野山茶为母本杂交产生的 11 个杂种的幼枝、叶的特征均与母本相似，H-86-1-1 的花与母本一致，H-87-2-2 的花兼有父母本的特征；H-78-1-1 的幼枝、叶的特征与父本相似，其花也兼有父母本的特征。有 9 株的酶谱为"互补型酶带"，且都出现了杂种带，为真正的杂种；其余 2 株的酶谱与母本一致，与其形态特征表现出一定的相关性，可能为非真正的杂种。同一个杂交组合产生的杂种，酶谱却有差异，金花茶最为特征的一条带（Rf=0.813）在其所有 11 个杂种 F1 代植株中都未表达。

关键词　山茶属；过氧化物酶同工酶；形态学比较；杂种

APPLICATION OF PEROXIDASE ISOZYMES TO IDENTIFICATION F1 HYBRIDS OF CAMELLIA

WANG Zhong-Lang, XIA Li-Fang
(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*, Kunming 650204)

Abstrsct　In this paper 12 F1 hybrids of four combinations were compared with their parents in morphology and peroxidase isozymes, the results indicated that: (1) Certain morphological characters may be used for initial identification of F1 hybrids. (2) Nine of all hybrids display both parental bands except one peculiar band of *C. chrysantha*, and possess "hybrid" – bands not observed in either parent; zymograms of the two other plants are the same as female parents, possibly not true hybrids. (3) The F1 hybrids produced from *C. chrysantha, C. reticulata* or *C. pitardii* var. *yunnanica* express various zymograms. Based on the above, we propose that it is a much effective method to identify F1 hybrids by using peroxidase isozyme variations.

Key words　*Camellia;* Peroxidase isozymes; Morphological comparison; Hybrid

山茶花是中国的十大名花之一，其杂交育种工作一向受到育种工作者的重视，培育出重瓣且开黄色或蓝紫色花、有香味、树型好的品种是茶花爱好者梦寐以求的目标。金花茶（*C. chrysantha*）是我国的一级保护植物，小花山茶（*C. forrestii*）具有香味，都是重要的育种材料。由于山茶属植物是常绿的灌木或乔木，育种周期长，很有必要在早

1991 年 6 月收稿，同年 10 月定稿。

期鉴定杂种F1代。目前有报道从形态学[1]、生化学[2]角度对山茶属植物杂种F1代进行鉴定。过氧化物酶同工酶是单基因编码的单肽链酶，目前已被广泛应用于白菜[3-5]、栗树[6]、一品红[7]、相思树[8]等植物杂种F1代的早期鉴定，但尚未见应用于山茶属植物的报道。

材料与方法

本文所用材料列于表1，均定植于本所植物园中。亲本的种子、幼枝、叶及花的特征都是实地观察每一个植株并结合Sealy[9]、胡先骕[10]的描述得到的，与杂种F1的比较结果列于表2。由于山茶属植物的叶子富含丹宁、酚类物质、酚氧化酶等，细胞破碎后，酚类物质很容易被氧化为醌，醌极易与酶复合而使酶失活[11]。本文经比较实验，选用6年龄株上的成熟健康叶，在液体氮下研成粉沫，加入适量的磷酸缓冲液（pH=6.5）内含0.01mol/l $Na_2S_2O_5$, 0.005mol/l EDTA，0.5%牛血清白蛋白，0.005mol/l抗坏血酸。半小时后，在17000rpm、4℃下离心10分钟，取上清液。电泳采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶不连续电泳系统，分离胶浓度为6%，凝胶缓冲液为Tris-HCl、pH=8.8，浓缩胶浓度为3%，缓冲液为Tris-HCl、pH=6.8，电极缓冲液为Tris-Gly、pH=8.3，电泳在150伏、4℃水循环中进行，染色采用醋酸联苯胺法[12]。根据Rf值大小和酶谱强弱绘模式图，并做干板及照相。

表1. 用于过氧化物酶同工酶分析的杂种及其亲本名录

Table 1. List of hybrids and their parents in analysing peroxidase isozymes

编号 No.	母本 Female parent	父本 Male parent	授粉 时间 Date of pollination	首花时间 First flowering time
H-87-1-1	云南野山茶 *C. pitardii* var *yunnanica*	金花茶 *C. chrysantha*	87年12月	——————*
H-87-1-2			87年12月	——————
H-87-1-3			87年12月	——————
H-86-1-1	云南山茶cv. 宫 粉 *C. reticulata* cv. Pink Palace	金花茶 *C. chrysantha*	86年1月	90年11月28日
H-87-9-1			87年 1月	——————
H-87-9-2			87年 1月	——————
H-87-9-3			87年 1月	——————
H-87-9-4			87年 2月	——————
H-87-2-1	云南山茶实生苗 *C. reticulata* Seedling	金花茶 *C. chrysantha*	87年12月	——————
H-87-2-2			87年 1月	——————
H-87-2-3			87年 1月	——————
H-78-1-1	云南山茶 *C. reticulata*	小花山茶 *C. forrestii*	78年12月	82年12月1日

* ————表示还未开花　Note:————too young to bloom

结果与分析

亲本与杂种F1代形态学比较

(1) 幼枝与叶片的形态学比较　从表 2 可以看出，以金花茶为父本，云南山茶或云南野山茶为母本，杂交产生的 F1 代，幼枝与叶的特征都与母本相似，H−78−1−1 的幼枝与叶的特征与父本小花山茶相似。

(2) 花结构的比较　H−86−1−1 的花各部分的特征与母本“宫粉”完全一致（表 2），只是花期（始花 11 月 28 日）比“宫粉”（始花 12 月底）早些，而父本金花茶的花特征未表达。H−87−2−2 的花兼有父母本的特征，其花蕾近球形，花柄长 0.3—0.4cm，花柱 3—4 条而象父本金花茶，其余特征都与母本云南山茶实生苗相似。H−78−1−1 也兼有父母本的特征，其花白色、微带红晕，花径 4.5cm 介于两亲本之间；其子房被白色柔毛而象母本；其余特征如无花柄、具香味、花柱长 0.9cm 等都与父本相似。

表 2. 杂种 F1 代形态学特征的初步鉴定

Table 2.　Morphological characters used for initial identification of interspcific hybrids

杂　种	幼　枝		叶　　片					花								
	毛被	颜色	大小	颜色	中脉	细脉	边缘	花柄	花蕾	香味	花色	花径	花瓣	花柱	柱头	子房
H−87−1−1	f	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H−87−1−2	f	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H−87−1−3	f	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H−86−1−1	s	f	f	f	s	f	f	f	f	s	f	f	f	f	f	f
H−87−9−1	s	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H−87−9−2	s	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H−87−9−3	s	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H−87−9−4	s	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H−87−2−1	s	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H−87−2−2	s	f	f	f	s	f	f	m	m	s	f	f	f	m	m	f
H−87−2−3	s	f	f	f	s	f	f	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H−87−1−1	m	m	m	s	m	m	m	m	m	m	i	i	m	m	s	f

注：m—象父本；f—象母本；i—中间特征；s—与双亲相似的特征。

Note: m—resemblance to male parent;　f—resemblance to female parent;
i—intermediate characters;　s—characters similar to both parents.

(3) 子叶和下胚轴比较　金花茶具 2—6 个子叶，多数为 3 个，子叶及下胚轴从深红到紫红色，云南山茶和云南野山茶都具 2 个子叶，子叶及下胚轴白色到黄白色，云南山茶×金花茶、云南野山茶×金花茶真正的杂种一般有 2 个子叶，少数有 3 个子叶，子叶及下胚轴一般为红色，因此，子叶及下胚轴的颜色表现是早期鉴别以金花茶为父本的 F1 代的简捷方法。

过氧化物酶同工酶分析

云南野山茶与金花茶的杂种 F1 代 3 个植株的酶带数都明显地比父母本多，母本云

南野山茶的3条酶带在3个F1代都有表现，父本金花茶5条带中的4条（Rf值分别为0.550，0.314，0.225，0.186）在F1代也有表现，但金花茶最为特征的一条带（Rf=0.813，该酶带泳动速度很快在我们所做的22种山茶中都未检测到）在3个F1代植株都未表达。这3个F1代植株都出现了父母本所没有的杂种带，但其间的酶谱有差异（图1:2, 3, 4；图3:C, F)。

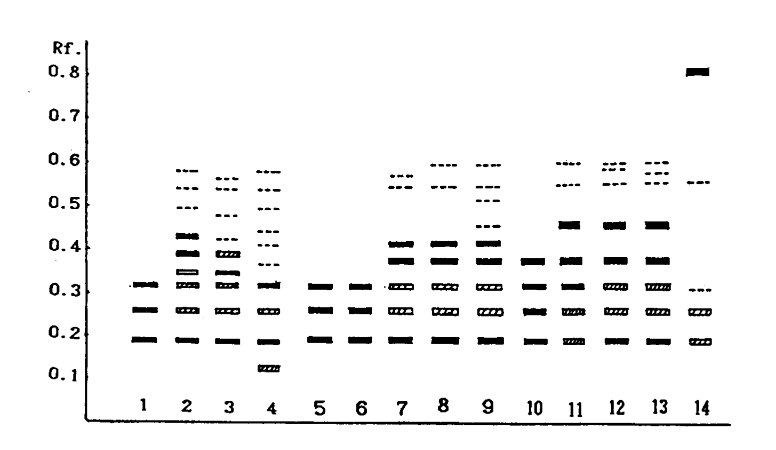


图1.金花茶、云南山茶、云南野山茶及其杂种的过氧化物酶同工酶模式图

Fig.1.Peroxidase isozyme spetrum

1.*C. pitardii* var. *yunnanica;* 2.H-87-1-1; 3.H-87-1-3; 4.H-87-1-2; 5.*C. reticulata* cv. "Pink Palace"; 6.H-86-1-1; 6.H87-9-3; 7.H-87-9-1; 8.H-87-9-2; 9.H-87-9-4; 10*C. reticulata* cv. "Seedling"; 11.H-87-2-2; 12.H-87-2-1; 13.H-87-2-3; 14.*C. chrysantha*

Rf.
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
1 2 3

图2.云南野山茶、小花山茶及其杂种的过氧化物酶同工酶模式图

Fig.2.Peroxidase isozyme spectrum

1.*C. petardii* var. *yunnanica;* 2.H-78-1-1; 3.*C. forrestii*

云南山茶品种“宫粉”与金花茶杂交产生的5个F1代，按酶谱可分为两类：第一，F1代的酶谱与母本“宫粉”完全一致，既无父本的特征带，也不出现杂种带，这一类包括H-86-1-1，H-87-9-3（图1:6；图3:C)。第二，F1代表现母本所有的带，父本的4条带也有表达，但另一条最为特征的带（Rf=0.813）在F1代都未表达，还出现了杂种带，其间的酶谱有差异（图1：7, 8, 9；图3：D, E)。

云南山茶实生苗与金花茶杂交产生的3个F1代植株之间的酶谱较为一致，母本云南山茶实生苗的4条带在F1代都有表达，父本金花茶的4条带也有表达，但最为特征的一条带未表达，都出现了杂种带，其间的酶谱也有差异（图1：11, 12, 13；图3：D, E)。

从以上3个以金花茶为父本的杂交组合之杂种F1代的过氧化物酶同工酶分析中可看出，除2株外，其余9株的酶谱为“偏母本的互补型”，这与形态特征表现出一定的相关性。

云南野山茶与小花山茶的杂种F1代（H-78-1-1）兼有父母本的所有酶带，并出现了3条杂种带。（图2；图3：F)

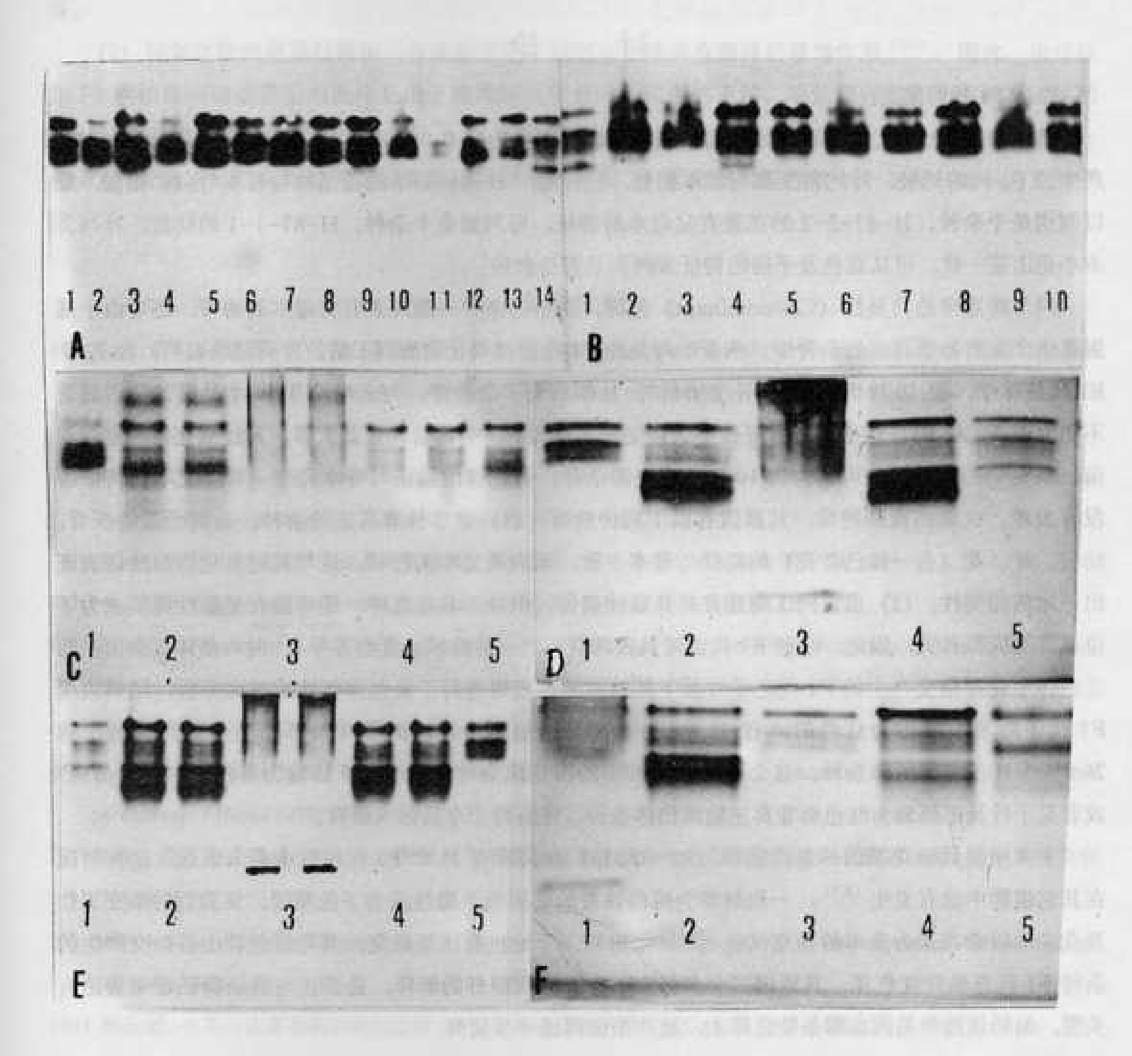


图3　酶谱照片

Fig.3　Photograph of peroxidase zymogram

A.Cultivars of *C. reticulata:* 1.Lion's Head 2.Early Crimson 3.Early Paeony 4.Super Chrysanthemum Petal 5.Super Paeony 6.Baby Face 7.Dwarf Rose 8.Chrysanthemum Petal 9.Red-mume 10.Golden Stamen Hibiscus 11."132" 12.Seedling 13.Seeding 14.Pink Palace

B.Cultivars of *C. reticualta:* 1.f. simplex 2.Pink Palace 3."132" 4.Seedling 5.Dwarf Rose 6.Red-mume 7.Baby Face 8.Early Paeony 9.Chrysanthemum Petal 10.Golden Stamen Hibiscus

C.1.*C. pitardii* var. *yunnanica* 2.H-87-1-2 3.*C. chrysantha* 4.H-87-9-3 5.*C. reticulata* cv. Pink Palace

D.1.*C. reticulata* Seedling 2.H-87-2-1 3.*C. chrysantha* 4.H-87-9-2 5.*C. reticulata* cv. Pink Palace

E.1.*C. reticulata* cv. Pink palace 2.H-87-9-4 3.*C. chrysantha* 4.H-87-2-3 5.*C. reticulata* Seedling

F.1.*C. chrysantha* 2.H-87-1-3 3.*C. pitardii* var. *yunnanica* 4.H-87-1-1 5.*C. forrestii*

讨 论

杂种F1代的鉴定

亲本与杂种F1代的形态学比较结果表明，以金花茶为父本，云南山茶或云南野山茶为母本杂交产生的F1代的幼枝、叶的特征都与母本相似，已开花的H–86–1–1的花结构与母本"宫粉"相似，难以判别是个杂种，H–87–2–2的花兼有父母本的特征，可判别是个杂种。H–87–1–1的幼枝、叶与父本小花山茶一致，可从花色及子房的特征来判别是否为杂种。

同工酶通常是共显性（Co–dominant）遗传，真正的杂种一般应兼有父母本的酶带，还可由于基因重组产生有异于双亲的杂种带。从亲本与杂种F1代的过氧化物酶同工酶的分析结果表明，在12个F1代植株中，有10株出现了"互补型酶谱"，且都出现了杂种带，与云南山茶14个品种的酶谱显著不同（图3：A, B），这些品种有好些是从自交种子得到的，如宫粉、金蕊芙蓉，其过氧化物酶谱与云南山茶完全一致，因此可认为这10株是真正的杂种。另2株的酶谱与母本完全一致，父本的特征带没有表现，也未出现杂种带，其原因有以下两种情形：（1）这2株非真正的杂种。从其形态特征看，幼枝、叶、花（有一株已开花）的特征与母本一致，未表现父本的性状，这与其过氧化物酶酶谱表现出一定的相关性。（2）虽说同工酶通常是共显性遗传，但并不总是这样，还可能有显隐性关系或为下位基因编码等有关，因此，杂种F1代也可只表现双亲之一的性状。夏丽芳等[1]对六倍体云南山茶与二倍体金花茶杂交产生的F1代之子叶及下胚轴的颜色表现进行了染色体倍性的对比分析，结果表明F1代子叶及下胚轴为红色的，有98.7%为真正的四倍体杂种，而子叶及下胚轴为黄白色的，有26.9%为真正的四倍体杂种。这2株是否为真正的四倍体杂种而子叶及下胚轴为黄白色中的一员呢？或者是子叶及下胚轴为红色而非真正的四倍体杂种，还有待于今后深入研究。

上文中提到金花茶的一条特征带（Rf＝0.813）在其所有11个F1代植株中都未表达，这种情况在其它植物中也有发生[4,7]，一般解释为编码该带的基因处于隐性或为下位基因。从我们的杂交工作及众多的以金花茶为亲本的杂交试验[13,14]中可知，不论正交还是反交，其与红色花山茶杂交产生的杂种F1代总是开红色花，其原因二十多年来一直未得到很好的解释，是否正与这条特征带未表达有关呢，编码该酶带基因在哪条染色体上，这些很值得进一步研究。

杂种F1代的酶谱多样性

分析结果表明，同一个杂交组合产生的F1代，酶谱表现却有差异，其中以云南山茶品种"宫粉"与金花茶杂交产生的杂种F1代间的差异最为显著，云南野山茶与金花茶杂交产生的杂种F1代间的差异次之，云南山茶实生苗与金花茶杂交产生的杂种F1代间的差异最小（图1）。分析其原因，主要有以下两个方面：

（1）亲本为杂合子　山茶属植物是异花授粉植物，自花结实率极低，且许多种之间都有较高的亲和力[14]。异花授粉，特别是不同株之花，必然导致种内及种间频繁的基因交流，杂合度相应地会比自花授粉的种高。Brown[15]等以10种针叶树和6种阔叶树的种群分析结果与草本植物进行了比较，发现异交种群的期望杂合度（He）为0.283–0.293，而自交种群为0.133，异交种群体的杂合度明显地比自交种群体高。所以，在种内和种间都有很高亲和力的云南山茶或云南野山茶，经过无数代的自然授粉和至少几百年的人工繁殖，杂合度可能较高。从减数分裂看[16]，采自云南腾冲沙坝林场的云南山茶在中期I形成了各种价体，表现出一定的杂合性，而金花茶在中期I形成稳定的二价体，因此，用于杂交的云南山茶或云南野山茶的基因可能不纯，导致F1代发生基因分离，从而表现出酶谱的差

异。

(2) 过氧化物酶翻译后修饰　有证据表明，过氧化物酶具有翻译后修饰作用[4,7]，因此，也可认为 F1 代植株间酶谱表达的差异是由于植株间生理条件等因素的不同，导致翻译后修饰的差异，从而表现出酶谱的差异。但同一个山茶种之 14 个品种间的过氧化物酶谱，经多次重复都非常一致（图 3: A, B），因此，我们认为过氧化物酶翻译后修饰是导致 F1 代酶谱多样性的一个方面，而不是主要原因。

参考文献

〔1〕 Xia L F, Gu Z J, Na H Y. et al. An easy technique to isolate true F1 Hybrids from the seedling pools obtained from artificial cross－pollination directly involoved yellow－flowered Camellia chrysantha. *Acta Bot Yunnanica* 1987; **9**(1):59 — 64

〔2〕 Nagata T, Sakai S. Caffeine, flavanal and amino acid contents in leaves of hybrids and species of the section Dubiae in the genus *Camellia*. *Japan J Breed* 1985; **35**:1 — 8

〔3〕 李玉湘. 白菜不同杂交组合过氧化物酶同工酶的研究. 园艺学报 1980; **7**(4): 20 —24

〔4〕 Iwasaki F. Zymogram analysis in Brassica species. *Jap J Breed* 1983; **33**(2): 173 — 177

〔5〕 Kato M, Tokumasu S. An electrophoretic study of esterase and peroxidase isozymes in Brassicoraphanus. *Euphytica* 1979; **28**:339 — 349

〔6〕 时兴春. 杂种栗树的过氧化物酶同工酶的研究. 林业科技通讯 1984; **8**:9 — 10

〔7〕 Wermer D J, Sins K C. Identification of poinsettia cultivars by electrophoretic analysis of proteins and peroxidase. *J Hered* 1977; **18**:35 — 40

〔8〕 江涛，潘富俊，马复京等. 直干相思树与耳荚相思树天然杂交之过氧化物酶同工酶佐证图. 中华林学季刊 1989; **22**(4): 107 — 109

〔9〕 Sealy R J. A revision of Genus Camellia. London and Colchester: Spottiswoode, Ballantyne and Company Limited press, 1958: 168 — 191

〔10〕 胡先骕. 山茶与连蕊茶属新种与变种（一）. 植物分类学报 1965; **10**(2): 131 — 142

〔11〕 Loomis W D, Battaile J. Plant phenolic componds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* 1966; **5**: 423 — 438

〔12〕 胡能书，万国贤. 同工酶技术及其应用. 长沙：湖南科学技术出版社，1985: 23 — 24

〔13〕 Hagiya K. Studies on interspecific hybridization of Camellia. *Bull Seibu Maizura Bot Inst* 1986; **2**:1 — 24

〔14〕 Parks C R. Cross－compatibility studies in the genus Camellia. *International Camellia Journal* 1990; **10**: 37 — 54

〔15〕 Brown A H D, Moran G F. Isozymes and the genetic resources of forest trees. In: Conkle M T. et. al. Isozymes of North American forest trees and forest insect U S D A,1980: 1—10

〔16〕 Xiao T J, Gu Z J, Xia L F et al. A karyomorphological study of ten species of Chinese Camellia. *La Kromosomo* 1991; Ⅱ—61: 2051—2058